

明細書

L- α -メチルシステイン誘導体の製造方法

技術分野

- 5 本発明は、医薬品中間体として有用なL- α -メチルシステイン誘導体またはその塩及びそれらの製造方法、上記L- α -メチルシステイン誘導体の中間体であるL-5-ハロメチル-5-メチルヒダントイン及びその製造方法、及びL-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン及びその製造法に関する。

10 背景技術

L- α -メチルシステイン誘導体またはその塩の製造方法としては、以下の方法が知られている。

- 1) 光学活性システインとピバルアルデヒドより得られる光学活性チアゾリジン化合物への不斉アルキル化による方法（特表2000-515166号公報、W
15 O01/72702号公報およびWO01/72703号公報（USP6403830、USP6586474、EP1265859A2、EP1265860A1）
- 2) 光学活性アラニンとベンズアルデヒドより得られる光学活性チアゾリジン化合物への不斉チオアルキル化による方法（Tetrahedron, 1999年
20 , 55巻, 10685～10694頁）
- 3) 光学活性バリンとアラニンより合成される光学活性ジケトピペラジン化合物を不斉プロモメチル化し、得られた化合物の臭素原子をアルカリ金属アルキルチオラートで置換する方法（J. Org. Chem., 1992年, 57巻, 5568～5573頁）。
- 25 4) 2-メチル-2-プロペン-1-オールのシャープレス不斉酸化により得られる光学活性な2-メチルグリシドールから光学活性アジリジン化合物を合成し、これにチオールを反応させる方法（J. Org. Chem., 1995年, 60巻, 790～791頁）。

5) アミノマロン酸誘導体をアルキル化した後に、豚肝臓エステラーゼ（以下PLEと略す）による非対称化を行い、得られた光学活性エステルをチオ酢酸アルカリ金属塩と反応させる方法（J. Am. Chem. Soc., 1993年, 115巻, 8449～8450頁）。

- 5 6) システイン誘導体より合成されるチアゾリン化合物のメチル化により得られるラセミ体のチアゾリン化合物をキラルHPLCにて分離精製する方法（Synlett., 1994年, 9巻, 702-704頁）。

しかしながら、1), 2), 3) のいずれの方法においても、ブチルリチウム等の高価な塩基を用いた低温反応が含まれ、特殊な製造設備が必要である。また、4) の方法は工程数が長くて煩雑であり、工業的に不利である。5) の方法ではPLEを用いたジエステルの非対称化を鍵工程としているが、PLEは大量生産が困難であるため工業的規模での安定確保は難しく、実用的とは言い難い。6) の方法ではチアゾリン化合物の不斉アルキル化は知られておらず、ラセミ体のキラルHPLCによる分割が不可欠であるが、不要の鏡像異性体をラセミ化して再利用することができないために生産性が低く、工業規模での製造は有利ではない。以上のように、いずれの方法においても光学活性 α -置換システインまたはその塩の工業的製造方法としては解決すべき課題を有している。

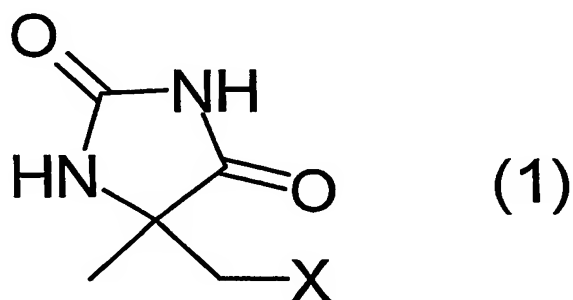
一方、ハロアセトンから容易に得られる5-ハロメチルー5-メチルヒダントインを、ヒダントイナーゼによる立体選択的な加水分解により光学活性なL-5-ハロメチルー5-メチルヒダントインとし、これと硫黄化剤との反応でL-5-メチルー5-チオメチルヒダントインを合成、これを加水分解することでL- α -メチルシステイン誘導体またはその塩の効率的なプロセスを構築できると考えられるが、ヒダントイナーゼを用いた立体選択的な加水分解による5位に2つの異なった置換基を有する光学活性ヒダントインの効率的な製造方法、および得られたヒダントインを加水分解することによる α 位に2つの異なる置換基を有する光学活性アミノ酸誘導体の製造方法は全く知られていない。

上記に鑑み、本発明の目的は、ラセミ体の5-ハロメチルー5-メチルヒダントインのヒダントイナーゼによるD立体選択的な加水分解プロセスを利用して、医薬品

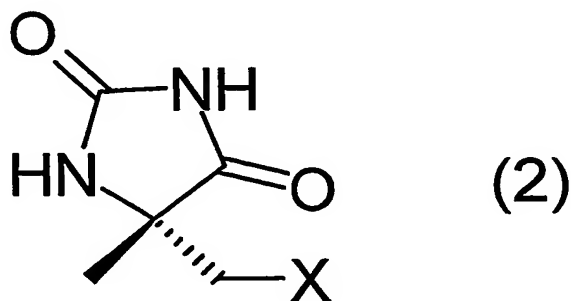
の中間体として有用なL- α -メチルシステインおよびその塩を安価で入手容易な原料から簡便に製造できる方法を提供することにある。

発明の要約

- 5 本発明者等は上記に鑑み、鋭意検討を行った結果、安価に入手可能なハロアセトンより容易に得られる5-ハロメチル-5-メチルヒダントインをヒダントイナーゼによりD立体選択的に加水分解し光学活性なL-5-ハロメチル-5-メチルヒダントインとし、これと硫黄化剤との反応でL-5-メチル-5-チオメチルヒダントインを合成、これを加水分解することによりL- α -メチルシステイン誘導体またはその塩を得る方法を見出し、本発明を完成するに至った。
- 10 すなわち本発明は一般式(1)；

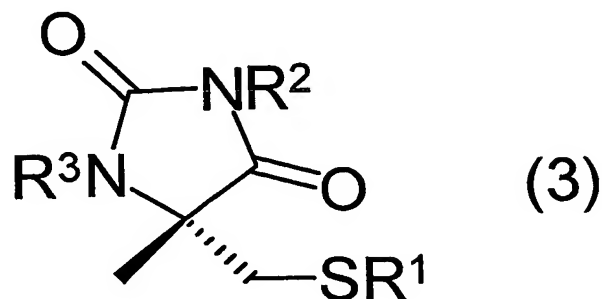


- (式中、Xはハロゲン原子を表す)で表される5-ハロメチル-5-メチルヒダントインのラセミ体を、ヒダントイナーゼによりD立体選択的に加水分解することを
- 15 特徴とする、一般式(2)；



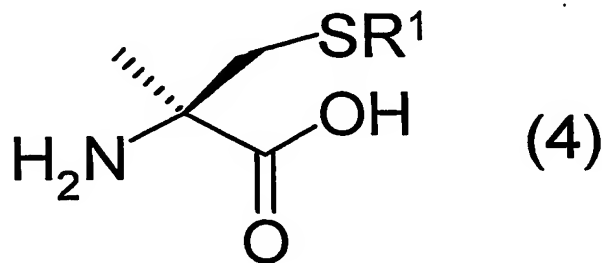
(式中、Xは前記と同じ)で表されるL-5-ハロメチル-5-メチルヒダントインの製造方法に関する。

また本発明は、前記式（２）で表されるＬ－５－ハロメチルー５－メチルヒダントインを硫黄化剤と反応させることを特徴とする、一般式（３）；



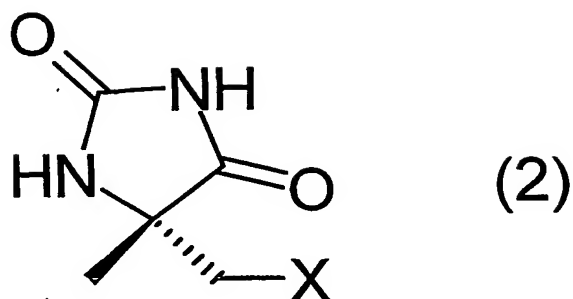
- 5 （式中、 R^1 は水素原子、 $C_1 \sim C_{20}$ の直鎖または分岐あるいは環を形成していても良いアルキル基、置換基を有してもよいベンジル基、 $C_1 \sim C_{20}$ のアルカノイル基、又は $C_1 \sim C_{20}$ のアルコキシカルボニル基を表し、 R^2 、 R^3 はそれぞれ独立に水素原子もしくは $C_1 \sim C_{20}$ のアルカノイル基を表し、互いに同じまたは異なってもよい）で表されるＬ－５－メチルー５－チオメチルヒダントインの製造方法に関する。
- 10

さらに本発明は、前記式（３）で表されるＬ－５－メチルー５－チオメチルヒダントインを酸またはアルカリで加水分解し、必要に応じて窒素原子、硫黄原子の脱保護を行うことを特徴とする一般式（４）；



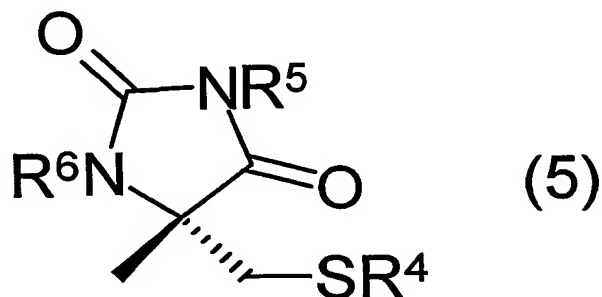
- 15 （式中、 R^1 は前記と同じ）で表されるＬ－ α －メチルシステイン誘導体またはその塩の製造方法に関する。

また、本発明は前記式（２）；



(式中、Xは前記と同じ) で表されるL-5-ハロメチルー5-メチルヒダントインである。

更に本発明は前記式 (5) ;

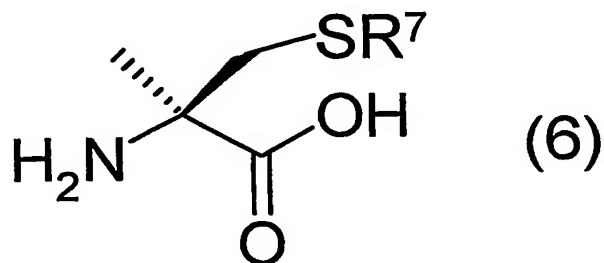


5

(式中、 R^4 は $C_1 \sim C_{20}$ の直鎖または2級、あるいは環を形成していても良いアルキル基、置換基を有してもよいベンジル基、 $C_1 \sim C_{20}$ のアルカノイル基、又は $C_1 \sim C_{20}$ のアルコキシカルボニル基を表し、 R^5 、 R^6 はそれぞれ独立に水素原子もしくは $C_1 \sim C_{20}$ のアルカノイル基を表し、互いに同じまたは異なってもよい) で表されるL-5-メチルー5-チオメチルヒダントインでもある。

10

さらに本発明は前記式 (6) ;



(式中、 R^7 は置換基を有していてもよいベンジル基、 $C_1 \sim C_{20}$ のアルカノイル基、または $C_1 \sim C_{20}$ のアルコキシカルボニル基を表す) で示されるL- α -メチルシ

STEIN誘導体またはその塩でもある。

発明の詳細な開示

以下、本発明を詳細に説明する。

- 5 本発明では、まず、前記式(1)で表されるラセミ体の5-ハロメチル-5-メチルヒダントインをヒダントイナーゼを用いてD立体選択的に加水分解して、前記式(2)で表されるL-5-ハロメチル-5-メチルヒダントインを製造する。

ラセミ体の5-ハロメチル-5-メチルヒダントイン(1)は、例えばB u c
10 h e r e r法により容易に取得できる。すなわち相当するハロケトンシアン化ナトリウムあるいはシアン化カリウムおよび炭酸アンモニウムと水、エタノール混合溶媒中で攪拌することにより目的とするヒダントインを合成することができる。

本工程で用いるヒダントイナーゼとは、5-置換ヒダントイン誘導体を加水分解
15 してN-カルバモイル- α -アミノ酸誘導体を生成する活性を有する酵素である。本発明で用いる立体選択的な加水分解を触媒するヒダントイナーゼとしては、動物、植物、微生物由来のものが使用できるが、工業的な利用には微生物由来のものが好ましい。微生物としては、当該酵素の生産能力を有する微生物であればいずれも利用できるが、例えば、以下の公知の、当該酵素の生産能力を有する微生物を挙げ
20 ることができる。

すなわち、細菌に属するものとしてはアセトバクター属(A c e t o b a c t e r)
r)、アクロモバクター属(A c h r o m o b a c t e r)、アエロバクター属(A e r o b a c t e r)、アグロバクテリウム属(A g r o b a c t e r i u m)、アルカリゲネス属(A l c a l i g e n e s)、アルスロバクター属(A r t h
25 r o b a c t e r)、バチルス属(B a c i l l u s)、ブレヴィバクテリウム属(B r e v i b a c t e r i u m)、コリネバクテリウム属(C o r y n e b a c t e r i u m)、エンテロバクター属(E n t e r o b a c t e r)、エルウイニア属(E r w i n i a)、エシエリヒア属(E s c h e r i c h i a)、クレブシエ

ラ属 (*Klebsiella*)、マイクロバクテリウム属 (*Microbacterium*)、マイクロコッカス属 (*Micrococcus*)、プロタミノバクター属 (*Protaminobacter*)、プロテウス属 (*Proteus*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas*)、サルチナ属 (*Sartina*)、セラチア属 (*Serratia*)、キサントモナス属 (*Xanthomonas*)、アエロモナス属 (*Aeromonas*)、フラボバクテリウム属 (*Flavobacterium*)、リゾビウム属 (*Rhizobium*) など、

放線菌に属するものとしてはアクチノミセス属 (*Actinomyces*)、ミコバクテリウム属 (*Mycobacterium*)、ノカルディア属 (*Nocardia*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*)、アクチノプラネス属 (*Actinoplanes*)、ロドコッカス属 (*Rhodococcus*) など、

かびに属するものとしてはアスペルギルス属 (*Aspergillus*)、パエシロミセス属 (*Paecilomyces*)、ペニシリウム属 (*Penicillium*) など、

酵母に属するものとしてはキャンディダ属 (*Candida*)、ピヒア属 (*Phichia*)、ロードトルラ属 (*Rhodotorula*) 又はトルロプシス属 (*Torulopsis*) などがある。

好ましくは、アグロバクテリウム属 (*Agrobacterium*)、バチルス属 (*Bacillus*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas*) 又はリゾビウム属 (*Rhizobium*) に属する微生物由来の酵素が挙げられる。

さらに好ましくは、アグロバクテリウム・スピーシーズ (*Agrobacterium* sp.) KNK712 (FERM BP-1900)、バチルス・スピーシーズ (*Bacillus* sp.) KNK245 (FERM BP-4863)、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) IFO12996、シュードモナス・スピーシーズ (*Pseudomonas* sp.) KNK003A (FERM BP-3181) 又はリゾビウム・スピーシーズ (*Rhizobium* sp.) KNK1415 (FERM BP-4419) 由来の酵素

が挙げられる。

なお、本発明中、当該ヒダントイナーゼは酵素自体、或いは本酵素活性を有する微生物若しくはその処理物等、及び本酵素活性を有する形質転換微生物或いはその処理物で用いられ得る。

- 5 ここで、微生物の処理物とは、例えば、粗抽出液、培養菌体凍結乾燥生物体、アセトン乾燥生物体、またはそれらの菌体の破砕物を意味する。更にそれらは、酵素自体あるいは菌体のまま公知の手段で固定化されて用いられ得る。固定化は当業者に周知の方法である架橋法、共有結合法、イオン結合法、物理的吸着法、包括法などで行い得る。酵素の固定化に使用される支持体としては、例えば、D u o l i t e A 5 6 8またはD S 1 7 1 8 6（ローム・アンド・ハース社：登録商標）などのフェノールホルムアルデヒド陰イオン交換樹脂、A m b e r l i t e I R A 9 3 5、I R A 9 4 5、I R A 9 0 1（ローム・アンド・ハース社：登録商標）、L e w a t i t O C 1 0 3 7（バイエル社：登録商標）、D i a i o n E X - 0 5（三菱化学：登録商標）などのポリスチレン樹脂のような各種アミンやアンモニウム塩あるいはジエタノールアミン型の官能基を持つ各種の陰イオン交換樹脂が適している。その他、D E A E - セルロースなどの支持体も使用することができる。

- 15 固定化酵素の好適な製造方法としては、例えば、W O 9 6 / 2 0 2 7 5 に示す方法で行い得る。すなわち、ヒダントイナーゼ活性を有する菌株の培養液を集菌、超音波などにより菌体を破砕後、得られた酵素液に例えば陰イオン交換樹脂D u o l i t e A - 5 6 8を加えて攪拌して酵素を吸着させることができる。この酵素を吸着した樹脂に例えばグルタルアルデヒドなどの架橋試薬を加えて攪拌することで架橋処理を行い、さらに安定性を向上させることもできる。これらの処理を行った後に樹脂を濾集、洗浄して固定化ヒダントイナーゼを得ることができる。

- 25 ヒダントイナーゼを効率良く高生産する高活性菌を得るためには、周知のとおり、形質転換微生物を作成することが有効である。作成方法としては、例えばW O 9 6 / 2 0 2 7 5 記載のように、ヒダントイナーゼ活性を示す菌株からヒダントイナーゼ遺伝子をクローニングした後、適当なベクターとの組換えプラスミドを作成して、これを用いて適当な宿主菌を形質転換することで得られる。なお、

組換えDNA技術については当該分野において周知であり、例えば、M o l e c u l a r C l o n i n g 2 n d E d i t i o n (C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s , 1 9 8 9) 、 C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y
5 (G r e e n e P u b l i s h i n g A s s o c i a t e s a n d W i l e y - I n t e r s c i e n c e) に記載されている。

このようにして得られた、ヒダントイナーゼを高生産する形質転換微生物としてはWO 9 6 / 2 0 2 7 5 記載の、バチルス・スピーシーズ (B a c i l l u s s p .) K N K 2 4 5 (F E R M B P - 4 8 6 3) 由来のヒダントイナーゼ遺伝子
10 を含有するエシェリヒア・コリ (E s c h e r i c h i a c o l i) H B 1 0 1 p T H 1 0 4 (F E R M B P - 4 8 6 4) 、アグロバクテリウム・スピーシーズ (A g r o b a c t e r i u m s p .) K N K 7 1 2 (F E R M B P - 1 9 0 0) 由来のヒダントイナーゼ遺伝子を含有するエシェリヒア・コリ (E s c h e r i c h i a c o l i) H B 1 0 1 p A H 1 0 4 3 (F E R M B P - 4 8 6
15 5) 、又はシュドモナス・スピーシーズ (P s e u d o m o n a s s p .) K N K 0 0 3 A (F E R M B P - 3 1 8 1) 由来のヒダントイナーゼ遺伝子を含有するエシェリヒア・コリ (E s c h e r i c h i a c o l i) H B 1 0 1 p P H D 3 0 1 (F E R M B P - 4 8 6 6) を挙げることができる。

これら形質転換体によるヒダントイナーゼの生産、あるいは、前述のヒダントイ
20 ナーゼ活性を示す菌株によるヒダントイナーゼの生産は、例えば、WO 9 6 / 2 0 2 7 5 記載の、通常の栄養培地を用いて培養を行えば良く、必用に応じて、酵素誘導のための処理を行うこともできる。

本発明の酵素反応は以下の方法で行うことができる。基質としては前記式 (1) で表されるラセミ体の 5 - ハロメチルー 5 - メチルヒダントインを用いてヒダ
25 ントイナーゼ存在下、水性媒体中で反応を行う。

基質の仕込み濃度は 0 . 1 % 以上、9 0 % (w / v) 以下で溶解または懸濁した状態で反応を行い、反応温度は 1 0 ° C 以上、8 0 ° C 以下の適当な温度で調節し、p H 4 以上、1 0 以下に保ちつつ暫時静置または攪拌すればよい。また、基質を連続

的に添加しうる。反応は、バッチ法または連続方式で行い得る。

本発明の反応は、固定化酵素、膜リアクターなどを利用して行うことも可能である。ヒダントイナーゼとしては、前述のごとく酵素自体、或いは、本酵素活性を有する微生物若しくはその処理物等、及び本酵素活性を有する形質転換微生物或いはその処理物で用いられ得る。水性媒体としては、水、緩衝液、これらにエタノールのような水溶性有機溶媒を含む水性媒体、あるいは、水に溶解しにくい有機溶媒、たとえば、酢酸エチル、酢酸ブチル、トルエン、クロロホルム、*n*-ヘキサンなどの有機溶媒を含む水性媒体との2層系などの適当な溶媒を用いることができる。さらに必用に応じて、抗酸化剤、界面活性剤、補酵素、金属などを添加することもできる。

以上のようにして得られたL-5-ハロメチル-5-メチルヒダントインは、特に精製せずにそのまま次工程に用いることができるが、光学純度、化学純度向上のためには晶析にて精製することが好ましい。

晶析に用いる溶媒としては、例えば、酢酸エチル、メチルアルコール、エチルアルコール、プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、*n*-ブチルアルコール、*sec*-ブチルアルコール、*tert*-ブチルアルコール、アセトン、テトラヒドロフラン、アセトニトリル等が挙げられる。これらは、単独で使用しても2種以上の混合溶媒として用いてもよい。なかでも酢酸エチル、又はエタノールが好ましい。また、晶析においては、収率向上の観点から貧溶媒を併用してもよく、貧溶媒の例としてはベンゼン、トルエン、ヘキサン、ヘプタン、シクロヘキサンが挙げられ、好ましくはヘキサン、ヘプタンである。

次に、前記式(2)で表されるL-5-ハロメチル-5-メチルヒダントインを硫黄化剤と反応させて前記式(3)で表されるL-5-メチル-5-チオメチルヒダントインを製造する方法について説明する。

前記式(3)において、 R^1 は水素原子、 $C_1 \sim C_{20}$ の直鎖または分岐あるいは環を形成していても良いアルキル基、置換基を有してもよいベンジル基、又は $C_1 \sim C_{20}$ のアルカノイル基を表わす。

$C_1 \sim C_{20}$ の直鎖または分岐あるいは環を形成していても良いアルキル基とし

てはメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、*t*-ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基などが挙げられるが、脱保護の容易さから *t*-ブチル基が好ましい。

- 5 置換基を有してもよいベンジル基としては、ベンジル基、*o*-または *p*-メトキシベンジル基、*o*-または *p*-ヒドロキシベンジル基、*o*-または *p*-アセトキシベンジル基、*p*-ニトロベンジル基、2, 4, 6-トリメチルベンジル基、2, 4, 6-トリメトキシベンジル基が挙げられるが、脱保護の容易さからベンジル基または *p*-メトキシベンジル基が好ましい。

- 10 $C_1 \sim C_{20}$ のアルカノイル基としてはアセチル基、プロパノイル基、ブタノイル基、ペンタノイル基、ヘキサノイル基などが挙げられるが、導入、脱保護の容易さからアセチル基が好ましい。

- $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシカルボニル基としては一般的に S (硫黄) の保護基として用いられるものであれば特に制限されるものではないが、ベンジルオキシカルボニル基、*t*-ブチルオキシカルボニル基が好ましい。R², R³ はそれぞれ独立に水素原子もしくは $C_1 \sim C_{20}$ のアルカノイル基を表し、互いに同じまたは異な
- 15 っているもよい。

- $C_1 \sim C_{20}$ のアルカノイル基としてはアセチル基、プロパノイル基、ブタノイル基、ペンタノイル基、ヘキサノイル基などが挙げられるが、導入、脱保護の容易さからアセチル基が好ましい。
- 20

- 本反応で用いる硫黄化剤としては、例えば水硫化ナトリウム、水硫化カリウム、水硫化カルシウム、水硫化バリウム、水硫化マグネシウム、水硫化リチウム、水硫化ルビジウム等のアルカリ金属もしくはアルカリ土類金属の水硫化物；水硫化アンモニウム；*t*-ブチルメルカプタン等のアルキルメルカプタン；ベンジルメルカプタン、*p*-メトキシベンジルメルカプタン等のアラルキルメルカプタン；チオ酢酸カリウム、チオ酢酸等のチオアシル化合物等が挙げられる。
- 25

工業的に安価で入手が容易であることや取り扱いの簡便さおよび反応収率が良好で硫黄原子の脱保護操作が不要であることなどの点から、水硫化ナトリウム

または水硫化カリウムが望ましい。なお、チオ酢酸やチオ酢酸カリウム等のチオカルボン酸又はその塩を硫黄化剤として用いた場合、窒素上にアシル基が導入されることがある。

本反応は塩基の共存下に行うことが好ましく、塩基としては例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸カリウム、炭酸ナトリウム等が挙げられる。

反応溶媒としては、使用する硫黄化剤にもより特に限定されるものではないが、例えば水硫化ナトリウムまたは水硫化カリウム等を用いる場合、水またはメチルアルコール、エチルアルコール、*n*-ブチルアルコール、*t*-ブチルアルコール、イソプロピルアルコール等のアルコール類、ジメチルスルホキシド、ジエチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド等の非プロトン性極性溶媒の群より選ばれる溶媒を単独あるいは混合して用いることが好ましい。

得られたL-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン(3)は、特に精製操作を行わずに次工程に使用しても良いし、化学純度向上、光学純度向上のために晶析等により精製してもよい。

次に、L-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン(3)の加水分解について説明する。

ヒダントイン部分の加水分解は酸もしくはアルカリ性水溶液のどちらでも可能であるが、ヒダントイン(3)におけるR¹と加水分解条件によって、加水分解後にL- α -メチルシステインもしくはその塩が得られる場合と、更に硫黄原子の脱保護が必要となる場合がある。

例えば、R¹が*t*-ブチル基の場合、アルカリ性水溶液では、更なる硫黄原子の脱保護が必要となるが、塩酸による加水分解では硫黄原子の脱*t*-ブチル化反応が同時に進行しL- α -メチルシステイン塩酸塩が得られることがわかった。

またR¹がアセチル基の場合には酸でもアルカリでも硫黄原子の脱アセチル化が同時に進行し、L- α -メチルシステインまたはその塩が得られる。さらにR¹がベンジル基の場合、加水分解後ナトリウム等を用いた脱保護が必要となる。

酸加水分解を行う場合、酸としては特に限定されないが、例えば塩酸、硫酸、硝酸、臭化水素酸、酢酸等が挙げられ、これらを単独または混酸として用いることが好ましい。

5 アルカリ加水分解を行う場合、アルカリの例としては水酸化ナトリウム、水酸化バリウム、水酸化リチウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム等が挙げられ、反応収率の面から水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化バリウム、水酸化カルシウム、水酸化リチウムが特に好ましい。

10 加水分解の反応温度については好ましくは70°Cから180°Cであり、用いた溶媒の沸点以上で反応を行う場合には耐圧反応器を用い封管中で行うことが好ましい。反応温度があまり低いと反応時間が非常に長くなり数日を要するだけでなく、ジスルフィド体が副生する傾向にあり、高すぎると他の副反応も懸念されるため、加水分解は90°Cから150°Cの範囲で行うことがより好ましい。

L-5-ハロメチル-5-メチルヒダントインへの硫黄化および加水分解は、アルカリ水溶液中、ワンポットで行うことも可能である。

15 用いるアルカリ水溶液としては例えば、水酸化ナトリウム、水酸化バリウム、水酸化リチウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、水酸化セシウムなどが挙げられるが、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウムが好ましい。この場合の硫黄化剤としては、特に限定されるものではないが、例えばベンジルメルカプタン、p-メトキシベンジルメルカプタン、n-ブチルメルカプタン、sec-ブチルメルカプタン、プロピルメルカプタンなどが挙げられるが、ベン
20 ジルメルカプタンあるいはt-ブチルメルカプタンが好ましい。

反応温度は硫黄化反応は0°Cから100°Cが好ましく、特に20°Cから80°Cが好ましい。続く加水分解は前記と同じく好ましくは70°Cから180°Cであり、更に好ましくは90°Cから150°Cである。

25 ヒダントイン(3)の加水分解によりL- α -メチルシステインまたはその塩を製造する場合、ジスルフィド体が副生することがあるが、その場合副生したジスルフィド体は還元剤にて、L- α -メチルシステインまたはその塩に戻すことができる。

還元剤としては、ジスルフィド結合を切断し得るものであれば特に限定されるものではないが、例えば亜鉛、錫、マグネシウムなどの金属あるいはホスフィン化合物が挙げられる。中でも優れた切断能を有し、しかも抽出操作での除去が容易なトリアリールホスフィン又はトリアルキルホスフィン化合物が好ましく、トリフェニルホスフィンが取り扱いの容易さ、価格の面から特に好ましい。

発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を挙げ、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

10 (参考例1) 5-メチルー5-クロロメチルヒダントインの製造法

炭酸アンモニウム (753 g, 6.6 mol), シアン化ナトリウム (135 g, 2.75 mol) を室温で蒸留水 (730 mL) に溶かしエタノール (730 mL) を加えた。さらにクロロアセトン (204 g, 2.2 mol) を加え10分間攪拌した後、60°Cまで加熱しそのまま一晩攪拌した。反応液を室温まで放冷後、約半分の液量まで減圧下溶媒を留去した。30 wt %水酸化ナトリウム水溶液約400 gを加えpHを12に調整し、トルエンで洗浄した (1.5 L×2)。氷冷下、濃塩酸700 gを加えpHを7とし、酢酸エチルにて抽出した (2 L×2)。得られた有機層を無水硫酸マグネシウムにて乾燥した後に減圧下濃縮し、白色固体198.5 gを得た。HPLC分析 (カラム: COSMOSIL 5C8 (ナカライ社製), 移動相: アセトニトリル/10 mMリン酸二水素カリウム水溶液=30/70, 流速: 0.8 ml/min, 検出波長: 210 nm, カラム温度: 40°C) の結果、この白色固体は上記表題化合物を192.5 g (1.2 mol) を含有していた (収率54%)。この白色固体は精製することなく次の工程に使用した。

¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ: 3.86 (d, 1H), 3.75 (d, 1H), 1.51 (s, 3H)。

(実施例1) L-5-クロロメチルー5-メチルヒダントインの製造法

WO 96/20275 記載の培養方法と固定化酵素の調製方法に従い、バチルス sp. KNK245株 (FERM BP-4863) を培養、集菌後、超音波

破碎して得た酵素液に固定化用担体である陰イオン交換樹脂、Duolite A-568を添加して酵素を吸着させ、さらにグルタルアルデヒドで架橋処理することで固定化ヒダントイナーゼを得た。

次に、参考例1で得たラセミ体の5-クロロメチルー5-メチルヒダントイン粗結晶9.1g (83.6wt%)に水91mlと0.5M硫酸マンガン水溶液0.18mlを加え20wt%水酸化ナトリウム水溶液によりpH8.7に調整した溶液に、上記の様にして得られた固定化ヒダントイナーゼ32g (湿重量)を加えて、45℃、25時間攪拌して反応させた。反応中は20wt%水酸化ナトリウム水溶液によりpHを8.7に保った。反応終了後、固定化ヒダントイナーゼをろ別、
10 洗浄して得られた濾液を6N塩酸によりpH7に調整した後、等量の酢酸エチルで二回抽出した。得られた酢酸エチル層に無水硫酸ナトリウム80gを添加して乾燥させた後、減圧濃縮乾固して3.35gの5-クロロメチルー5-メチルヒダントインを取得した。

これをHPLC分析 (カラム: CHIROBIOTIC T (アドバンスト・セパレーション・テクノロジーズ・インク社製) 2本連結, 移動相: 水/エチルアルコール=9/1, 流速: 0.3ml/min, 検出波長: 210nm, カラム温度: 40℃) した結果、化学純度は91.8wt%、光学純度は97.0% ee、ヒダントイン収率は40.5%であった。

また、得られた光学活性ヒダントインがL体であることを、実施例8から24に示す方法でメチルシステインに誘導して旋光度を測定することで確認した。
20

(実施例2) L-5-クロロメチルー5-メチルヒダントインの製造法

アグロバクテリウム sp. KNK712株 (FERM BP-1900) を固体培地 (10g/1 ポリペプトン、10g/1 肉エキス、5g/1 イーストエキス、15g/1、pH7.5) で30℃、48時間培養した。この菌体一白
25 金耳を、500ml容坂口フラスコに入れ120℃で15分間殺菌した50mlの液体培地 (10g/1 ポリペプトン、10g/1 肉エキス、5g/1 イーストエキス、pH7.5) に植菌して30℃、24時間振とう培養した。次に、この培養液1mlを、上記液体培地に1g/1 ウラシル、20mg/1 塩化マンガ

ンを加えた液体培地に植菌し、30℃にて24時間振とう培養した。この培養液15mlから遠心分離により得られた菌体を1.5mlの0.1M炭酸緩衝液(pH 8.7)に懸濁し、ラセミ体の5-クロロメチルー5-メチルヒダントイン45mgと0.1M硫酸マンガン水溶液0.015mlを添加し、10N水酸化ナトリウム水溶液によりpHを8.7付近に保ち、40℃で26時間攪拌して反応させた。反応液をHPLC分析(カラム: COSMOSIL 5C8-MS (ナカライ社製), 移動相: アセトニトリル/10mMリン酸二水素カリウム水溶液=5/95, 流速: 0.8ml/min, 検出波長: 210nm, カラム温度: 40℃)した結果、ヒダントインの残存率は39%であった。さらに、反応液中ヒダントインの光学純度をHPLC分析(実施例1記載の分析条件)したところ92.7% eeであり、また、実施例1で得られたヒダントインとのリテンションタイムの比較からL体であることを確認した。

(実施例3) シュードモナス属細菌を用いたL-5-クロロメチルー5-メチルヒダントインの製造法

15 シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) IFO12996を固体培地(10g/l ポリペプトン、2g/l イーストエキス、1g/l 硫酸マグネシウム七水和物、15g/l 寒天、pH7.0)で30℃にて24時間培養した。この菌体一白金耳を、500ml容坂口フラスコ中、120℃で15分間殺菌した100ml液体培地(20g/l 肉エキス、6g/l グリセロール、1g/l ウラシル、2g/l リン酸二水素カリウム、1g/l 硫酸マグネシウム七水和物、40mg/l 塩化カルシウム二水和物、20mg/l 硫酸第一鉄七水和物、20mg/l 硫酸マンガン四～六水和物、20mg/l 硫酸銅五水和物、pH5.5)に植菌し、30℃にて24時間振とう培養した。この培養液15mlから遠心分離により得られた菌体を1.5mlの0.1M炭酸緩衝液(pH 8.7)に懸濁し、ラセミ体の5-クロロメチルー5-メチルヒダントイン15mgと0.5M硫酸マンガン水溶液0.003mlを添加後、10N水酸化ナトリウム水溶液によりpHを9.0付近に保ちつつ、40℃で52時間攪拌して反応させた。反応液をHPLC分析(実施例2記載の分析条件)した結果、ヒ

ダントインの残存率は70%であった。さらに、反応液中ヒダントインの光学純度をHPLC分析（実施例1記載の分析条件）したところ26.7% eeであり、また、実施例1で得られたヒダントインとのリテンションタイムの比較からL体であることを確認した。

5 (実施例4) バチルス属細菌を用いたL-5-クロロメチル-5-メチルヒダントインの製造法

バチルス sp. KNK245株 (FERM BP-4863) の乾燥保存菌体を、500ml 容坂口フラスコ中、120℃で15分間殺菌した100ml 液体培地（10g/1 ポリペプトン、10g/1 肉エキス、5g/1 イーストエキス、pH7.5）に植菌し、45℃にて15時間振とう培養した。この培養液2mlを、上記培地成分に更に1g/1 ウラシル、20mg/1 塩化マンガンを加えた培地に植菌し、45℃にて24時間振とう培養した。この培養液15mlから遠心分離により得られた菌体を1.5mlの0.1M炭酸緩衝液（pH8.7）に懸濁し、ラセミ体の5-クロロメチル-5-メチルヒダントイン15mgと0.15M硫酸マンガン水溶液0.003mlを添加後、10N水酸化ナトリウム水溶液によりpHを9.0付近に保ちつつ、40℃で52時間攪拌して反応させた。反応液をHPLC分析（実施例2記載の分析条件）した結果、ヒダントインの残存率は74%であった。さらに、反応液中ヒダントインの光学純度をHPLC分析（実施例1記載の分析条件）したところ30.7% eeであり、また、実施例1で得られたヒダントインとのリテンションタイムの比較からL体であることを確認した。

20 (実施例5) リゾビウム属細菌を用いたL-5-クロロメチル-5-メチルヒダントインの製造法

リゾビウム sp. KNK1415株 (FERM BP-4419) の乾燥保存菌体を、500ml 容坂口フラスコ中、120℃で15分間殺菌した100ml 液体培地（10g/1 ポリペプトン、10g/1 肉エキス、5g/1 イーストエキス、pH7.5）に植菌し、30℃にて18時間振とう培養した。この培養液1mlを、上記培地成分に更に1g/1 ウラシル、20mg/1 塩化マンガンを加えた培地に植菌し、30℃にて24時間振とう培養した。この培養液15ml

1 から遠心分離により得られた菌体を 1.5 ml の 0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 8.7) に懸濁し、ラセミ体の 5-クロロメチル-5-メチルヒダントイン 15 mg と 0.5 M 硫酸マンガン水溶液 0.003 ml を添加後、10 N 水酸化ナトリウム水溶液により pH を 9.0 付近に保ちつつ、40℃ で 32 時間攪拌して反応させた。

- 5 反応液を HPLC 分析 (実施例 2 記載の分析条件) した結果、ヒダントインの残存率は 54% であった。さらに、反応液中ヒダントインの光学純度を HPLC 分析 (カラム: CHIROBIOTIC T (アドバンスド・セパレーション・テクノロジー・インク社製、2 本連結)、移動相: 0.036 M リン酸二水素カリウム / リン酸水溶液 pH 2.2、流速: 0.5 ml/min、検出波長: 210 nm、カラム温度: 40℃) したところ 22.5% ee であり、また、実施例 1 で得られたヒダントインとのリテンションタイムの比較から L 体であることを確認した。

(実施例 6) シュードモナス sp. KNK003A 株 (FERM BP-3181) を用いた L-5-クロロメチル-5-メチルヒダントインの製造法

- 15 シュードモナス sp. KNK003A 株 (FERM BP-3181) の乾燥保存菌体を、500 ml 容坂口フラスコ中、120℃ で 15 分間殺菌した 100 ml 液体培地 (10 g/l グリセリン、5 g/l グルコース、0.3 g/l イーストエキス、3.5 g/l リン酸二水素カリウム、3.5 g/l リン酸水素二ナトリウム、0.5 g/l 硫酸マグネシウム七水和物、0.02 g/l 塩化マンガン四水和物、0.01 g/l 硫酸鉄七水和物、1 g/l 炭酸カルシウム、3 g/l N-カルバモイル-D-アラニン、pH 7.0、ただしグルコースと N-カルバモイル-D-アラニンは他の成分を加熱殺菌後、ろ過滅菌して添加) に植菌し、45℃ にて 46 時間振とう培養した。この培養液 40 ml から遠心分離により得られた菌体を 1.5 ml の 0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 8.7) に懸濁し、ラセミ体の 5-クロロメチル-5-メチルヒダントイン 15 mg と 0.5 M 硫酸マンガン水溶液 0.003 ml を添加後、10 N 水酸化ナトリウム水溶液により pH を 9.0 付近に保ちつつ、45℃ で 24 時間攪拌して反応させた。反応液を HPLC 分析 (実施例 2 記載の分析条件) した結果、ヒダントインの残存率は 54% であった。さらに、反応液中ヒダントインの光学純度を HPLC 分析 (実施例 5 記載の

分析条件) したところ 65.8% ee であり、また、実施例 1 で得られたヒダントインとのリテンションタイムの比較から L 体であることを確認した。

(実施例 7) L-5-メチル-5-クロロメチルヒダントインの精製法

実施例 1 の様にして得られた未精製 L-5-メチル-5-クロロメチルヒダント
5 イン (68.85 g) をエチルアルコール (137.7 mL) に溶かした後、60°C に加熱した。ヘキサンを内温が 60°C より低くならないように注意しながら、白色の濁りが消えなくなるまでゆっくりと適下した (ヘキサン使用量: 105 mL) 後、-20°C まで徐々に冷却しそのまま -20°C で一晩攪拌した。析出した白色結晶をろ別、メチルアルコールの 5 wt% ヘキサン溶液 (250 g) にて洗浄する
10 ことにより表題化合物を化学純度 94.6%, 光学純度 98.3% ee で得た (晶析回収率 94.7%) (参考例 1 記載の分析条件にて分析)。

(実施例 8) L-5-メルカプトメチル-5-メチルヒダントインの製造法

L-5-クロロメチル-5-メチルヒダントイン (15.0 g, 化学純度 87 wt%, 光学純度 98.3% ee, 80 mmol), 水硫化ナトリウム (60 g, 純
15 度 70 wt%) を蒸留水 150 g に溶解させ、窒素雰囲気下、1.5 時間還流させた。室温まで放冷後、氷冷下、濃塩酸で pH=1 とし、酢酸エチルにて抽出した (500 mL × 4)。得られた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後に減圧下で濃縮し、白色固体 14.8 g を得た。HPLC 分析 (カラム: COSMOSIL
L C18-AR (ナカライ社製), 移動相: リン酸二水素カリウム・リン酸水溶液 (pH 2.0) / アセトニトリル = 97/3, 流速: 1.0 mL/min, 検出
20 波長: 210 nm, カラム温度: 30°C) の結果、この白色固体は上記表題化合物を 11.1 g (64.5 mmol) を含有していた (化学純度 75.0%, 収率 80.7%)。

¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ: 3.52 (d, 1H), 3.32 (d, 1H), 1.40 (s, 3H)。

25

(実施例 9) L-5-メルカプトメチル-5-メチルヒダントインの精製法

L-5-メルカプトメチル-5-クロロメチルヒダントイン (2.04 g, 化学純度 83.6%, 光学純度 96.1% ee) を酢酸エチル (40 mL) に 60°C で

溶かし、ヘキサンを白色の濁りが消えなくなるまでゆっくりと適下した（ヘキサン
使用量：90 mL）。0°Cまで徐々に冷却しそのまま0°Cで1時間攪拌した。析
出した白色結晶をろ別、ヘキサン（50 mL）にて洗浄することにより、表題化合
物を晶析回収率92.4%，化学純度91.3%，光学純度98.6% eeで得た
5 （化学純度は実施例8記載の分析条件にて分析。光学純度分析条件；カラム：CH
IRALPAK AS（ダイセル社製），移動相：イソプロパノール／ヘキサン＝
3／7，流速：0.5 mL/min，検出波長：210 nm，カラム温度：30°C
）。

（実施例10）L-5-メチルー5-tert-ブチルチオメチルヒダントインの製造

10 法

L-5-クロロメチルー5-メチルヒダントイン（10.00 g，61.51 mmol）を10 wt %水酸化ナトリウム水溶液100 gに溶解させた後、tert-ブチルメルカプタン（10.4 mL，92.27 mmol）を加え、窒素下、50°Cで
3時間攪拌した。室温まで放冷後、反応液をトルエンで洗浄した（100 mL×3
15 ））。濃塩酸を加え反応混合物のpHを1～2に調整し、生成する白色固体をろ過に
て分離し、水で洗浄した（100 mL×3）後、減圧下乾燥し、表題化合物を白色
固体として得た（7.79 g，収率58.6%）（参考例1記載の分析条件にて分
析）。

¹H NMR （300 MHz，CD₃OD） δ：2.89（s，2H），1.4
20 6（s，3H），1.31（s，9H）。

（実施例11）L-5-メチルー5-ベンジルチオメチルヒダントインの製造法

L-5-クロロメチルー5-メチルヒダントイン（10 g，61.5 mmol）
を10 wt %水酸化ナトリウム水溶液100 gに溶解させた後、ベンジルメルカプ
タン（11.5 mL，98.4 mmol）を加え、窒素下、50°Cで 3時間攪拌
25 した。室温まで放冷後、反応液をトルエンで洗浄した（20 mL×2）。濃塩酸を
加え反応混合物のpHを2.0に調整し、生成する白色固体をろ過にて分離し、水
で洗浄した後、減圧下乾燥し、表題化合物を白色固体として得た（14.82 g，
収率96.3%）（参考例1記載の分析条件にて分析）。

^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ : 8.61 (s, 1H), 7.34–7.26 (m, 5H), 6.06 (s, 1H), 3.76 (d, 1H), 3.72 (d, 1H), 2.79 (d, 1H), 2.72 (d, 1H), 1.45 (s, 3H)。

5 (実施例12) L-1-N-アセチル-5-アセチルチオメチル-5-メチルヒダントインの製造法

L-5-クロロメチル-5-メチルヒダントイン (5.88g, 34.22mmol, 化学純度94.6%, 光学純度98.3% ee) を窒素雰囲気下、ジメチルスルホキシド (137g) に溶解し、チオ酢酸カリウム (14.05g, 123.0mmol) を加え70°Cで21時間反応させた。室温まで放冷後、10%塩酸水溶液にてpH=6~7に調整し、酢酸エチルで抽出した。得られた有機相を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、酢酸エチルを減圧下留去することにより、オレンジ色の固体12.45gを得た。HPLC分析 (参考例1記載の分析条件にて分析) の結果、このオレンジ色固体は上記表題化合物を5.48g (22.43mmol, 化学純度44%) を含有していた (収率65.5%)。

10

15

^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ : 8.61 (s, 1H), 7.27 (s, 1H), 3.92 (d, 1H), 3.48 (d, 1H), 2.54 (s, 3H), 2.33 (s, 3H), 1.80 (s, 3H)。

20 (実施例13) L-1-N-アセチル-5-アセチルチオメチル-5-メチルヒダントインの精製法

上記実施例で得られたL-1-N-アセチル-5-アセチルチオメチル-5-クロロメチルヒダントイン (5.48g) を酢酸エチル (22g) に溶かし、60°Cに加熱した。ヘキサンを白色の濁りが消えなくなるまでゆっくりと適下し (ヘキサン使用量: 39.2g)、室温まで放冷後、そのまま20時間攪拌、続いて-20°Cまで徐々に冷却し-20°Cで6時間攪拌した。析出した白色結晶をろ別、酢酸エチルの1%ヘキサン溶液 (39.2g) にて洗浄することにより、表題化合物を晶析回収率78.3%, 化学純度87.1%, 光学純度99.1% eeで得た (化学純度は参考例1記載の分析条件にて分析。光学純度はHPLC分析 (カラム: CH

25

IRALCEL OD-H (ダイセル社製), 移動相: ヘキサン/イソプロパノール=9/1, 流速: 1.0 ml/min, 検出波長: 210 nm, カラム温度: 30°C) にて決定)。

(実施例 14) L-2-ベンジルチオメチルアラニンの製造法

- 5 L-5-ベンジルチオメチルー5-メチルヒダントイン (5.0 g, 20 mmol) を 2 規定水酸化ナトリウム水溶液 (40 g) に溶解し、100°C で 2 日間、攪拌した。室温まで放冷後、濃塩酸で pH=7 に調整し析出した白色結晶をろ別、水で数回洗浄した。減圧下、乾燥させた後、得られた白色結晶を ^1H NMR, HPLC にて分析 (参考例 1 記載の分析条件にて分析) し、上記目的物であることを確認した (収率 78%)。

^1H NMR (300 MHz, NaOD/D₂O) δ : 7.28–7.08 (m, 5H), 3.71 (s, 2H), 2.88 (d, 1H), 2.72 (d, 1H), 1.31 (s, 3H)。

(実施例 15) L-2-t-ブチルチオメチルアラニンの製造法

- 15 L-5-t-ブチルチオメチルー5-メチルヒダントイン (1.00 g, 4.62 mmol) を 10 wt% 水酸化ナトリウム水溶液 (14.97 g) に溶解し、110°C で 3 日間、攪拌した。室温まで放冷後、4M 塩酸で pH=6.5 に調整し析出した白沈をろ別した。ろ液を濃縮し、生成した白色結晶をろ別後、水で数回洗浄した。減圧下、乾燥させた後、得られた白色結晶を ^1H NMR, HPLC にて分析 (参考例 1 記載の分析条件にて分析) し、上記目的物であることを確認した (収率 78.8%)。

^1H NMR (300 MHz, NaOD/D₂O) δ : 2.65 (d, 1H), 2.63 (d, 1H), 1.25 (s, 12H)。

(実施例 16) L-2-ベンジルチオメチルアラニンの製造法

- 25 L-5-クロロメチルー5-メチルヒダントイン (200 mg, 1.23 mmol) を 10 wt% 水酸化ナトリウム水溶液 2.0 g に溶解させた後、ベンジルメルカプタン (0.23 mL, 2.0 mmol) を加え、窒素下、50°C で 5 時間攪拌した。反応温度を 100°C に上げ、さらに 26 時間攪拌した。30 wt% 水酸化ナ

トリウム水溶液を1.0 g 加えさらに24時間100℃で攪拌し、HPLC分析したところ、表題化合物が生成していることを確認した（収率78.0%）。

（実施例17）L-2-tert-ブチルチオメチルアラニンの製造法

L-5-クロロメチル-5-メチルヒダントイン（501.8 mg, 3.08 mmol）を10 wt %水酸化ナトリウム水溶液5.03 gに溶解させた後、tert-ブチルメルカプタン（0.55 mL, 4.87 mmol）を加え、窒素下、50℃で5.5時間攪拌した。反応温度を100℃に上げ、21時間攪拌した後、さらに10 wt %水酸化ナトリウム水溶液（5.00 g）を添加し、2日間攪拌した。反応後に室温まで放冷、4 M塩酸水溶液でpH=6.5に調整し析出した白沈をろ別した。ろ液を濃縮し、生成した白色結晶をろ別後、水で数回洗浄した。減圧下、乾燥させた後、得られた白色結晶を¹H NMR, HPLCにて分析（参考例1記載の分析条件にて分析）し、上記目的物であることを確認した（収率53.1%）。

（実施例18）L-α-メチルシステイン塩酸塩の製造法

L-β-ベンジルチオメチルアラニン（1 g, 4.44 mmol）を窒素下、液体アンモニア（50 mL）に溶解し78℃で金属ナトリウムを少しずつ加えた。溶液が青色を呈したら反応溶液が還流するまで温度を上げ、青色が消えるようであればさらに金属ナトリウムを追加しながら30分攪拌した。塩化アンモニウムを青色が消え反応溶液が白色となるまで加え、温度を上げて液体アンモニアを気化させることにより除去した。2 N塩酸水溶液でpH=1~2となるように調整し、水分を減圧下留去、得られた白色固体をさらに減圧下で一晩乾燥させた。白色固体にTHF（13 mL）、エチルアルコール（6.5 mL）を加えてスラリー化し約10分間攪拌し、不溶分をろ過にて除去した。母液を濃縮し、得られた白色固体をさらに減圧下で数時間乾燥させた。エチルアルコール、トルエンより晶析を行い、得られた白色結晶（473 mg）を¹H NMR, HPLC（カラム：CAPCELL PAK SCX（資生堂社製）、移動相：リン酸二水素カリウム・リン酸水溶液（pH2.0）／アセトニトリル=95／5、流速：0.3 mL/min、検出波長：210 nm、カラム温度：30℃）で分析したところ、上記目的物であることがわかった（収率62.6%）。また旋光度を測定したところ、 $[\alpha]_{D_{20}}=8.77$

(c 1. 15, H₂O) であり、符号が文献値 (T e t r a h e d r o n, 1993, 49, 2131~2138, WO98/38177) と一致することから立体が目的とするL体であることを確認した。

¹H NMR (300MHz, D₂O) δ: 3. 18 (d, 1H), 2. 89 (d, 1H), 1. 6 (s, 3H)。

(実施例19) L-α-メチルシステイン塩酸塩の製造法

L-β-トープチルチオメチルアラニン (433. 9mg, 2. 27mmol) を濃塩酸 (9mL) に溶解し、窒素下、4時間還流させた。室温まで放冷後、水分を減圧下留去、得られた白色固体をさらに真空ポンプで減圧乾燥した。白色固体に THF (6mL), エチルアルコール (2mL) を加えてスラリー化し約10分間攪拌し不溶分をろ過にて除去した。母液を濃縮し、得られた白色固体をさらに減圧下で数時間乾燥させた。エチルアルコール, トルエンより晶析を行い、得られた白色結晶 (229mg) を¹H NMR, HPLC (実施例18記載の分析条件) で分析したところ、上記目的物の塩酸塩であることがわかった (収率58. 7%)。

(実施例20) L-α-メチルシステイン塩酸塩の製造法

L-5-メルカプトメチルー5-メチルヒダントイン (1. 0g, 純度89. 2wt%, 光学純度98. 6%ee, 5. 57mmol) を濃塩酸 (20g) に溶解し、窒素下、60時間還流させた。室温まで放冷後、塩酸水溶液を減圧下留去し、THF (50mL), 1N塩酸水溶液 (5mL) およびトリフェニルホスフィン (2. 73g) を加え、窒素雰囲気下、50°Cで2時間反応させた。室温まで放冷後、全体の容量が約1/5となるまで濃縮し、酢酸エチル (50mL x 3) にて洗浄しトリフェニルホスフィン, トリフェニルホスフィンオキシド, 未反応ヒダントインおよびその他の不純物を除去した。水相を減圧下濃縮、得られた白色固体をさらに減圧下、一晚乾燥させた。白色固体にTHF (15. 6mL), エチルアルコール (7. 8mL) を加えてスラリー化し約10分間攪拌し、不溶分をろ過にて除去した。母液を濃縮し、表題化合物を白色固体として得た (879mg) ¹H NMR, HPLC (実施例18記載の分析条件) で分析したところ、上記目的物であることがわかった (収率92. 3%)。

(実施例 2 1) L- α -メチルシステイン塩酸塩の製造法

L-5-メルカプトメチル-5-メチルヒダントイン (500 mg, 純度 89.2 wt %, 光学純度 98.6 % ee, 2.78 mmol) を 30 wt % 水酸化ナトリウム水溶液 (5 g) に溶解し、窒素下、36 時間還流させた。室温まで放冷後、濃塩酸にて pH=1 に調整し水分を減圧下留去した。THF (30 mL), 1 N 塩酸水溶液 (3 mL) およびトリフェニルホスフィン (1.57 g) を加え、窒素雰囲気下、50 °C で 2 時間反応させた。室温まで放冷後、全体の容量が約 1/5 となるまで濃縮し、酢酸エチル (50 mL x 3) にて洗浄しトリフェニルホスフィン、トリフェニルホスフィンオキシド、未反応ヒダントインおよびその他の不純物を除去した。水相を減圧下濃縮、得られた白色固体をさらに減圧下、一晚乾燥させた。白色固体に THF (9.3 mL), エチルアルコール (4.7 mL) を加えてスラリー化し約 10 分間攪拌し、不溶分をろ過にて除去した。母液を濃縮し、表題化合物を白色固体として得た (348 mg) ¹H NMR, HPLC (実施例 18 記載の分析条件) で分析したところ、上記目的物であることがわかった (化学純度 74.1 %, 収率 48.0 %)。

(実施例 2 2) L- α -メチルシステイン塩酸塩の製造法

L-1-N-アセチル-5-アセチルチオメチル-5-メチルヒダントイン (3.4 g, 13.9 mmol) を濃塩酸 (34 g) に溶解し、窒素下、20 時間還流させた。濃塩酸 (34 g) を加えさらに 30 時間反応させた。室温まで放冷後、塩酸水溶液を減圧下留去し、THF (50 mL), 1 N 塩酸水溶液 (5 mL) およびトリフェニルホスフィン (2.17 g) を加え、窒素雰囲気下、50 °C で 2 時間反応させた。室温まで放冷後、全体の容量が約 1/5 となるまで濃縮し、酢酸エチルにて洗浄しトリフェニルホスフィン、トリフェニルホスフィンオキシド、未反応ヒダントインおよびその他の不純物を除去した。水相を減圧下濃縮、得られた白色固体をさらに減圧下、一晚乾燥させた。白色固体に THF (18 mL), エチルアルコール (6 mL) を加えてスラリー化し約 10 分間攪拌し、不溶分をろ過にて除去した。母液を濃縮し、得られた白色固体をさらに減圧下で数時間乾燥させた。エチルアルコール、トルエンより晶析を行い、得られた白色結晶 (1.02 g) を ¹H

NMR, HPLC (実施例18記載の分析条件)で分析したところ、上記目的物であることがわかった(収率43.0%)。

(実施例23) L- α -メチルシステイン塩酸塩の製造法

L-5-tert-ブチルチオメチル-L-5-メチルヒダントイン(202.3mg, 0.935mmol)を濃塩酸(4mL)に溶解し、窒素下、110℃で26時間攪拌した。室温まで放冷後、水分を減圧下留去、得られた残渣を¹H-NMR, HPLC (実施例18記載の分析条件)で分析した結果、L- α -メチルシステイン収率42.5%、L-5-メルカプトメチル-L-5-メチルヒダントイン収率53.7%であった。

10 (実施例24) L- α -メチルシステイン塩酸塩の製造法

L-5-tert-ブチルチオメチル-L-5-メチルヒダントイン(202.5mg, 0.936mmol)を濃塩酸(4mL)に溶解し、これを耐圧反応容器内に封管し、150℃で26時間攪拌した。室温まで放冷後、水分を減圧下留去、得られた残渣をHPLC (実施例18記載の分析条件)で分析した結果、L- α -メチルシステイン収率46.3%、L- α -メチルシステインのジスルフィド体収率53.7%であった。

(参考例2) L- α -メチルシステイン塩酸塩の光学純度決定法

実施例18記載の方法で得られたL- α -メチルシステイン塩酸塩(74.9mg, 0.44mmol)を水(3mL)に溶解させ、炭酸水素ナトリウム(197.7mg)を添加し、エタノール3mLを加えた。窒素置換後、クロロ炭酸ベンジルエステル(0.17mL, 1.10mmol)を加え、室温で2日間攪拌した。反応液に濃塩酸を添加してpH=1.9とし、酢酸エチルで抽出後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧下留去した。これをPTLC(ヘキサン/酢酸エチル=1/1に少量の酢酸を添加)で精製し¹H-NMRにて分析したところ目的物(25 106mg, 収率60%)であることがわかった。これをHPLCにて分析(カラム: CHIRALCEL OD-RH(ダイセル社製), 移動相: リン酸二水素カリウム・リン酸水溶液(pH2.0)/アセトニトリル=6/4, 流速: 1.0mL/min, 検出波長: 210nm, カラム温度: 30℃, 保持時間19.15分

(D) , 22.92分(L))した結果、光学純度は98.6% eeであった。

^1H NMR (300MHz, D_2O) δ : 7.30–7.40 (m, 10H) ,
5.22 (s, 2H) , 5.10 (s, 2H) , 3.60 (s, 2H) , 1.63
(s, 3H) 。

5 産業上の利用可能性

本発明により、医薬品中間体として有用なL- α -メチルシステイン誘導体またはその塩を安価で入手容易な原料から簡便に製造することができる。

10

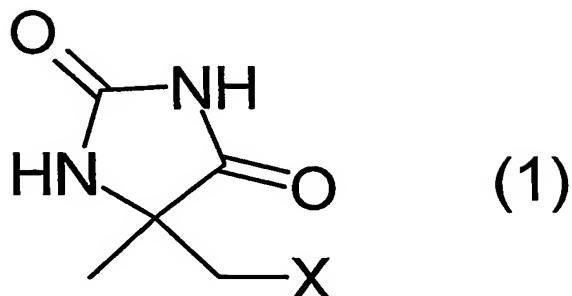
15

20

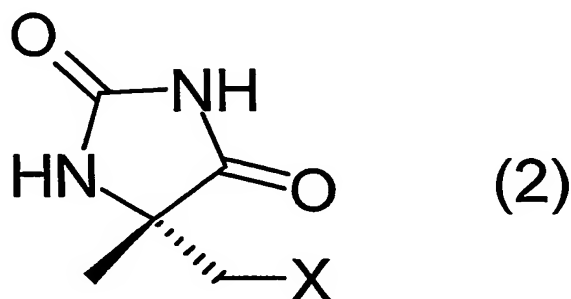
25

請求の範囲

1. 一般式 (1) ;



(式中、Xはハロゲン原子を表す) で表される 5-ハロメチル-5-メチルヒダントインのラセミ体を、ヒダントイナーゼによりD立体選択的に加水分解することを特徴とする、一般式 (2) ;



(式中、Xは前記と同じ) で表される L-5-ハロメチル-5-メチルヒダントインの製造方法。

2. Xが塩素原子であることを特徴とする請求の範囲第1記載の製造方法。
3. ヒダントイナーゼが、アグロバクテリウム属 (*Agrobacterium*)、バチルス属 (*Bacillus*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas*) 又はリゾビウム属 (*Rhizobium*) に属する微生物由来である請求の範囲第1又は第2記載の製造方法。
4. ヒダントイナーゼが、アグロバクテリウム・スピーシーズ (*Agrobacterium* sp.) KNK712 (FERM BP-1900)、バチルス・スピーシーズ (*Bacillus* sp.) KNK245 (FERM BP-4863)、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) IFO

12996、シュードモナス・スピーシーズ (*Pseudomonas* sp.)
KNK003A (FERM BP-3181) 又はリゾビウム・スピーシーズ (*Rhizobium* sp.)
KNK1415 (FERM BP-4419) 由来である請求の範囲第1又は第2記載の製造方法。

- 5 5. ヒダントイナーゼが、形質転換微生物エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) HB101 pTH104 (FERM BP-4864)、
エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) HB101 pAH1043 (FERM BP-4865)、又はエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) HB101 pPHD301 (FERM BP-4866)
10 由来である請求の範囲第1又は第2記載の製造方法。

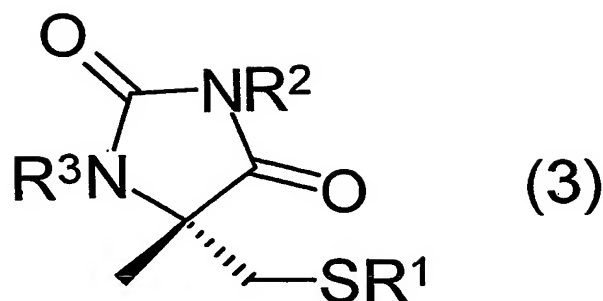
6. 前記式(2)で表されるL-5-ハロメチル-5-メチルヒダントインを、
酢酸エチル、メチルアルコール、エチルアルコール、プロピルアルコール、イソプロ
ピルアルコール、n-ブチルアルコール、sec-ブチルアルコール、t-ブチ
ルアルコール、アセトン、テトラヒドロフラン、及びアセトニトリルからなる群よ
15 り選択される少なくとも1種の溶媒を用いて晶析することにより、光学純度を向上
させることを特徴とするL-5-ハロメチル-5-メチルヒダントインの製造方法

。

7. 貧溶媒として、ベンゼン、トルエン、ヘキサン、ヘプタン、及びシクロヘキ
サンからなる群から選択される少なくとも1種の溶媒を併用する請求の範囲第6記
20 載の製造方法。

8. 晶析に供するL-5-ハロメチル-5-メチルヒダントインが、請求項1記
載の方法で製造されたものである請求の範囲第6又は第7記載の製造方法。

9. 前記式(2)で表されるL-5-ハロメチル-5-メチルヒダントインを硫
黄化剤と反応させることを特徴とする、一般式(3)；



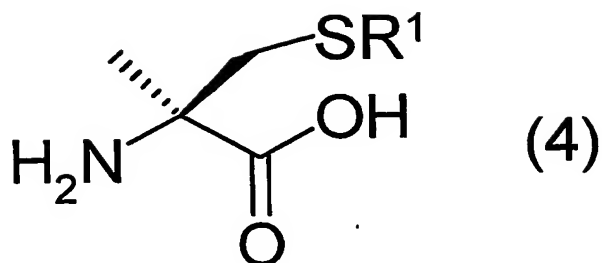
(式中、 R^1 は水素原子、 $C_1 \sim C_{20}$ の直鎖又は分岐あるいは環を形成していても良いアルキル基、置換基を有しても良いベンジル基、 $C_1 \sim C_{20}$ のアルカノイル基を表し、 R^2 、 R^3 はそれぞれ独立に水素原子もしくは $C_1 \sim C_{20}$ のアルカノイル基、 $C_1 \sim C_{20}$ のアルコキシカルボニル基を表し互いに同じ又は異なってもよい) で表される L-5-メチル-5-チオメチルヒダントインの製造方法。

10. 請求の範囲第1から第5のいずれかに記載の方法で得られた L-5-ハロメチル-5-メチルヒダントインを硫黄化剤と反応させることを特徴とする、請求の範囲第9記載の L-5-メチル-5-チオメチルヒダントインの製造方法。

11. 硫黄化剤として、アルカリ金属もしくはアルカリ土類金属の水硫化物、水硫化アンモニウム、アルキルメルカプタン、アラルキルメルカプタン、又はチオ酢酸もしくはそのアルカリ金属塩を用いることを特徴とする請求の範囲第9又は第10記載の製造方法。

12. 硫黄化剤として水硫化ナトリウム、水硫化カリウム、チオ酢酸カリウム、*t*-ブチルメルカプタン、ベンジルメルカプタン、又は *p*-メトキシベンジルメルカプタンを用いることを特徴とする、請求の範囲第9又は第10記載の製造方法。

13. 請求の範囲第9から第12のいずれかに記載の方法で得られた前記式(3)で表される L-5-メチル-5-チオメチルヒダントインを酸またはアルカリで加水分解および必要に応じて窒素原子、硫黄原子の脱保護を行うことを特徴とする一般式(4)；

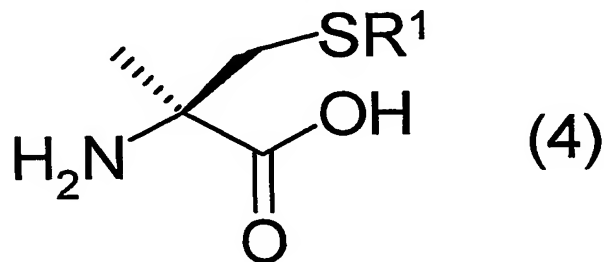


(式中、R¹は水素原子、C₁～C₂₀の直鎖または分岐あるいは環を形成していても良いアルキル基、置換基を有しても良いベンジル基、C₁～C₂₀のアルカノイル基、又はC₁～C₂₀のアルコキシカルボニル基を表す) で表される L-α-メチルシステイン誘導体またはその塩の製造方法。

1 4. 塩酸、硫酸、硝酸、臭化水素酸、酢酸、及びトリフルオロ酢酸からなる群より選択される少なくとも一種の酸を用いて加水分解を行う請求の範囲第 1 3 記載の製造方法。

1 5. 水酸化リチウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、水酸化バリウム、炭酸ナトリウム、及び炭酸カリウムからなる群より選択される少なくとも一種のアルカリを用いて加水分解を行う請求の範囲 1 3 記載の製造法。

1 6. 前記式 (2) で表される L-5-ハロメチルー 5-メチルヒダントインと硫黄化剤をアルカリ水溶液中で反応させ硫黄化と加水分解をワンポットで行い、必要に応じて硫黄原子の脱保護を行うことを特徴とする一般式 (4) ；



(式中、R¹は水素原子、C₁～C₂₀の直鎖または分岐あるいは環を形成していても良いアルキル基、置換基を有しても良いベンジル基、C₁～C₂₀のアルカノイル基、C₁～C₂₀のアルコキシカルボニル基を表す) で表される L-α-メチルシステイン誘導体またはその塩の製造方法。

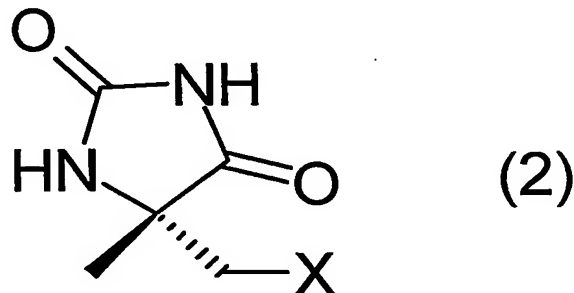
17. 請求の範囲第1から第5のいずれかに記載の方法で得られたL-5-ハロメチル-5-メチルヒダントインを用いることを特徴とする請求の範囲第16記載の製造方法。

18. 前記式(4)においてR¹が水素原子であるL-α-メチルシステインまたはその塩を製造するにあたり、副生したジスルフィド体のジスルフィド結合を還元剤を用いて切断することにより、L-α-メチルシステインまたはその塩に変換することを特徴とする請求の範囲第13から第16のいずれかに記載の製造方法。

19. 還元剤がトリアルキルホスフィンあるいはトリアリールホスフィンであることを特徴とする請求の範囲第18記載の製造法。

20. 還元剤がトリフェニルホスフィンであることを特徴とする請求の範囲第18記載の製造法。

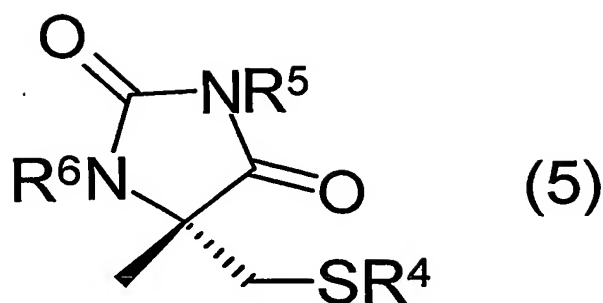
21. 一般式(2) ;



15 (式中、Xはハロゲン原子を表す) で表されるL-5-ハロメチル-5-メチルヒダントイン。

22. Xが塩素原子である請求の範囲第21記載の化合物。

23. 一般式(5) ;



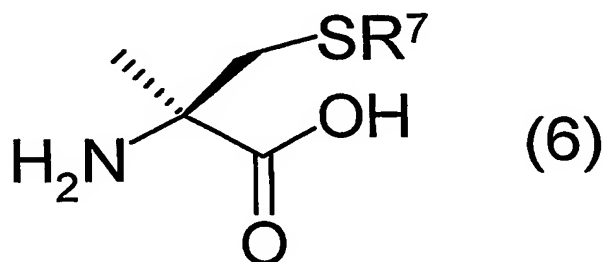
(式中、 R^4 は $C_1 \sim C_{20}$ の直鎖または2級、あるいは環を形成していても良いアルキル基、置換基を有しても良いベンジル基、 $C_1 \sim C_{20}$ のアルカノイル基、 $C_1 \sim C_{20}$ のアルコキシカルボニル基、 R^5 、 R^6 はそれぞれ独立に水素原子もしくは $C_1 \sim C_{20}$ のアルカノイル基を表し、互いに同じまたは異なってもよい) で表される L-5-メチル-5-チオメチルヒダントイン。

24. R^5 、 R^6 が水素原子、 R^4 がベンジル基もしくは p-メトキシベンジル基である請求の範囲第23記載の化合物。

25. R^4 、 R^6 がアセチル基、 R^5 が水素原子である請求の範囲第22記載の化合物。

26. R^4 、 R^5 、 R^6 が全てアセチル基である請求の範囲第23記載の化合物。

27. 一般式(6)；



(式中、 R^7 は置換基を有していても良いベンジル基、 $C_1 \sim C_{20}$ のアルカノイル基または $C_1 \sim C_{20}$ のアルコキシカルボニル基を表す) で示される L- α -メチルシステイン誘導体又は該化合物と酸との塩。

28. R^7 がベンジル基、p-メトキシベンジル基またはアセチル基である請求の範囲第27記載の化合物。

29. 酸が塩酸、臭化水素酸、硫酸、p-トルエンスルホン酸またはカンファ-

スルホン酸である請求の範囲第 27 記載の化合物。

5

10

15

20

25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10881

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12P17/14, 41/00, C07C319/14, 319/06, 323/58, C07D233/76//
C07B53/00, 61/00, C07M7:00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12P17/00-17/18, 41/00, C07C319/14, 319/06, 323/58,
C07D233/76

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/WPI (DIALOG), CA/REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), JSTplus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---------------|--|-----------------------------|
| <u>Y</u> A | EP 175312 A2. (KANEGAFUCHI KAGAKU KOGYO KABUSHIKI KAISHA), 26 March, 1986 (26.03.86), & JP 61-072762 A & US 4812406 A & JP 1-124398 A | <u>21-26</u> 1-20, 27-29 |
| <u>Y</u> A | TAHARA S. et al., Studies on α -Alkyl- α -amino Acids. Part II. Hydantoins Containing Chlorines on the Side-chain and their Alkaline Hydrolysis Products., Agr.Biol.Chem., 1971, Vol.35, No.11, pages 1806 to 1809 | <u>21-22</u> 1-20, 23-29 |
| <u>Y</u> A | TAHARA S. et al., Studies on α -Alkyl- α -amino Acids. Part I. Synthesis of S-Alkyl-2-methyl-DL-cysteines., Agr.Biol.Chem., 1971, Vol.35, No.1, pages 53 to 57 | <u>21-22</u> 1-20, 23-29 |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
31 October, 2003 (31.10.03)

Date of mailing of the international search report
18 November, 2003 (18.11.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10881

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---------------|--|-----------------------------|
| <u>Y</u> A | NISHIMURA A. et al., Radioprotective Effects of Thiomethylhydantoin Derivatives on Escherichia coli and Mice., Acta Med.Okayama 1987, Vol.41, No.5, pages 187 to 193 | <u>23-26</u> 1-22, 27-29 |
| <u>X</u> A | AKAJI K. et al., Total Synthesis of Thiagazole., Tetrahedron 1999, Vol.55, pages 10685 to 10694 | <u>27-29</u> 1-26 |
| A | EP 801131 A1 (Kanegafuchi Chemical Industry Co., Ltd.), 15 October, 1997 (15.10.97), & WO 96/20275 A1 | 1-29 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10881

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

While the invention of claim 1 and dependent claims is directed to the method of using a D-stereoselective hydrolysis process of racemic 5-halomethyl-5-methylhydantoin by hydantoinase, the invention of claims 6, 9 and 16 and dependent claims comprehends the method of not using the D-stereoselective hydrolysis process.

Therefore, the two inventions do not share special technical features "using a D-stereoselective hydrolysis process of racemic 5-halomethyl-5-methylhydantoin by hydantoinase", and hence these inventions cannot be recognized as being linked so as to form a single general inventive concept.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12P 17/14, 41/00, C07C 319/14, 319/06, 323/58, C07D 233/76 //C07B 53/00, 61/00, C07M 7:00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12P 17/00-17/18, 41/00, C07C 319/14, 319/06, 323/58, C07D 233/76

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使った電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/WPI (DIALOG), CA/REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), JSTPlus (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|-----------------------------|
| <u>Y</u> A | EP 175312 A2 (KANEGAFUCHI KAGAKU KOGYO KABUSHIKI KAISHA) 1986.03.26 & JP 61-072762 A & US 4812406 A & JP 1-124398 A | <u>21-26</u> 1-20, 27-29 |
| <u>Y</u> A | TAHARA S. et al. Studies on α -Alkyl- α -amino Acids. Part II. Hydantoins Containing Chlorines on the Side-chain and their Alkaline Hydrolysis Products. Agr. Biol. Chem. 1971, Vol. 35, No. 11, p. 1806-1809 | <u>21-22</u> 1-20, 23-29 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

31. 10. 03

国際調査報告の発送日

18.11.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

三原 健治



4N

2937

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|-----------------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| <u>Y</u> A | TAHARA S. et al. Studies on α -Alkyl- α -amino Acids. Part I. Synthesis of S-Alkyl-2-methyl-DL-cysteines. Agr. Biol. Chem. 1971, Vol. 35, No. 1, p. 53-57 | <u>21-22</u> 1-20, 23-29 |
| <u>Y</u> A | NISHIMURA A. et al. Radioprotective Effects of Thiomethylhydantoin Derivatives on <i>Escherichia coli</i> and Mice. Acta Med. Okayama 1987, Vol. 41, No. 5, p. 187-193 | <u>23-26</u> 1-22, 27-29 |
| <u>X</u> A | AKAJI K. et al. Total Synthesis of Thiagazole. Tetrahedron 1999, Vol. 55, p. 10685-10694 | <u>27-29</u> 1-26 |
| A | EP 801131 A1 (Kanegafuchi Chemical Industry Co., Ltd.) 1997. 10. 15 & WO 96/20275 A1 | 1-29 |

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1に代表されるラセミ体の5-ハロメチルー5-メチルヒダントインのヒダントイナーゼによるD立体選択的加水分解プロセスを利用する方法に対して、請求の範囲6, 9, 16に代表される発明は、上記D立体選択的加水分解プロセスを利用しない方法を含んでいる。

したがって、両者は「ラセミ体の5-ハロメチルー5-メチルヒダントインのヒダントイナーゼによるD立体選択的加水分解プロセスを利用する」という特別な技術的特徴を共有しているとはいえず、これらの発明は、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。